

16. 4. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

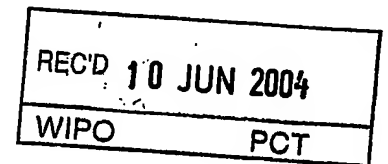
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月 2 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 3 3 9 6 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 4 3 3 9 6 9 ]

出 願 人            日立化成工業株式会社  
Applicant(s):

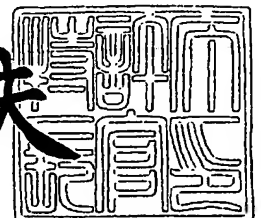


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   5 月 2 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 HTK-812  
【提出日】 平成15年12月26日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市和台 4 8 日立化成工業株式会社 総合研究所内  
    【氏名】 小林 照幸  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市和台 4 8 日立化成工業株式会社 総合研究所内  
    【氏名】 中山 紀行  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市和台 4 8 日立化成工業株式会社 総合研究所内  
    【氏名】 田村 鶴紀  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 日立化成工業株式会社内  
    【氏名】 金 文錫  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000004455  
    【氏名又は名称】 日立化成工業株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100083806  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 三好 秀和  
    【電話番号】 03-3504-3075  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100068342  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 三好 保男  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100100712  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岩▲崎▼ 幸邦  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100087365  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 栗原 彰  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100100929  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 川又 澄雄  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100095500  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 伊藤 正和  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100101247  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 高橋 俊一

【選任した代理人】

【識別番号】 100098327

【弁理士】

【氏名又は名称】 高松 俊雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001982

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 0302311

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

基板に固定化された鎖状分子を検出するための装置であつて、前記基板を保持する治具、前記基板と溶液とを収容する容器、探針、探針の検出器、前記基板又は前記探針を三次元方向に走査する駆動機構、及び、前記駆動機構を制御する駆動制御回路を具備することを特徴とする分子検出装置。

**【請求項 2】**

さらに、前記鎖状分子を視覚化する手段を有する請求項 1 記載の分子検出装置。

**【請求項 3】**

さらに、前記鎖状分子を計数する手段を有する請求項 1 又は 2 記載の分子検出装置。

**【請求項 4】**

さらに、前記鎖状分子の局在化の情報を与える手段を有する請求項 1～3 いずれか記載の分子検出装置。

**【請求項 5】**

さらに、鎖状分子が固定化された基板を判別する手段を有する請求項 4 記載の分子検出装置。

**【請求項 6】**

基板上に固定化された鎖状分子が、基板上に直立して配置された一本鎖分子である請求項 1～5 いずれか記載の分子検出装置。

**【請求項 7】**

直立して配置された一本鎖分子が、核酸、ペプチド核酸、ペプチド、糖ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、化学合成ポリマーまたはこれらの類似物質である請求項 6 記載の分子検出装置。

**【請求項 8】**

基板上に固定化された鎖状分子が、直立して配置された一本鎖分子と、前記一本鎖分子に結合可能な一本以上の鎖状分子とを含む多本鎖分子である請求項 1～5 いずれか記載の分子検出装置。

**【請求項 9】**

多本鎖分子が、核酸、ペプチド核酸、ペプチド、糖ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、化学合成ポリマーまたはこれらの類似物質から選ばれた 1 種または 2 種以上の分子の複合体である請求項 8 記載の分子検出装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】分子検出装置

【技術分野】

【0001】

本発明は、基板に固定化された鎖状分子を検出するための分子の検出装置に関する。さらに詳しくは、探針で分子をプロービングすることにより、直立した鎖状分子を視覚化すること、単位面積当たりの鎖状分子の数を計数すること、分子局在化の情報を得ること等を可能とする分子検出装置に関する。

【背景技術】

【0002】

基板上にDNAを固定化する方法としては、基板上に直接DNAを合成して固定化する方法と、あらかじめ別途合成したDNAを基板上に固定化する方法がある。前者の方法における技術はフォトリソグラフィ技術であり、この技術によって作られたものがDNAチップである。後者の方法は、メカニカルマイクロスポッティング技術であり、この技術によって作られたものがDNAマイクロアレイである。

【0003】

上記、DNAチップ又はDNAマイクロアレイにおいて、基板上に固定化されたDNAが局在化していると、これらを用いた遺伝子発現情報等の解析結果の信頼性低下につながる。つまり、基板上の意図する部分にDNAが均一に、ばらついて（非局在化して）固定化されていなければ定性的、定量的な解析に性能を発揮することができない。従来、基板上の特定の範囲に一本鎖DNAが均一に固定化されているか否かを分子レベルで調べる技術はなく、DNAチップ又はDNAマイクロアレイは非常に高価であるため、その検査技術の開発が望まれている。

【0004】

また、これらのDNAチップ又はDNAマイクロアレイに固定化されているDNAを検出するには、固定化されているDNAに蛍光ラベルした相補的なDNAをハイブリダイゼーションさせ、蛍光強度を測定することにより行うことが可能ではあるが、この方法では分子の局在化情報までは知りえない。

【0005】

上述のDNAチップ又はDNAマイクロアレイでの問題は、酵素免疫測定法（ELISA）で用いられるマイクロタイプレートや、タンパクチップにおいても同様である。つまり、基板上に固定化されたタンパク質分子を、これと親和性を有する色素などで染色して吸光度を測定する、蛍光ラベルしたタンパク質を結合させ蛍光強度を測定する等しても、単位面積当りのタンパク質濃度の平均値が求められるのみで、分子の局在化情報まで得ることはできない。

【0006】

基板上に固定化された分子の非局在化又は局在化の情報を得るための手段としては、電子顕微鏡などを用いた観察がある。しかし、この観察は真空下で行うので、生体高分子はその構造が壊れてしまい観察できないか、あるいは基板に密着するため基板との見分けができない。

【0007】

この他に、紫外分光法あるいは赤外分光法などによる基板表面のイメージングを行う技術が近年用いられているが、装置の構造上、測定視野が広いために、分子レベルでの局在化の情報を得ることは困難である。

【0008】

一方、分子を視覚化し、形状に関する情報を得るためには、走査型プローブ顕微鏡を用いた観察が知られている。核酸に関して言えば、走査型プローブ顕微鏡を用いた観察により、二本鎖核酸のらせん構造が確認されている（例えば、非特許文献1又は2参照。）。また、原子間力顕微鏡を用いて原子間力測定を行うことで一本鎖DNA、二本鎖DNAを区別できることも可能となった（例えば、非特許文献3参照。）。しかし、これらの技術

は核酸を基板に対し平行に吸着させているため、分子としての自由度が限定され、その後起こる反応のためには好ましくない不活性な状態における観察であると言わざるを得ない。

【0009】

上記のようなDNAチップ、DNAマイクロアレイ等においては、鎖状分子が活性状態に保った状態で基板に固定化されている。即ち、基板上で分子を直立させることにより、分子の自由度を増すとともに、反応部位をより開放して反応性を向上させている。従って、上述の核酸を基板に対して平行に吸着させた観察方法は、DNAチップ、DNAマイクロアレイ等の観察には適さない。

【0010】

さらに、基板表面に固定化されたDNAを解析する装置として、走査型プローブ顕微鏡を用いた装置が知られているが、この装置は、1本のDNA鎖の塩基配列を決定する方法に用いられるものである（例えば、特許文献1又は2参照。）。

【0011】

そこで、DNAチップ、DNAマイクロアレイ等の鎖状分子が多数固定化された基板において、鎖状分子の活性を保った状態で、分子を視覚化し、計数し、さらに、分子の局在化の情報を簡便に得ることができる分子検出装置が求められている。

【特許文献1】特開平6-289017号公報

【特許文献2】特開2001-124687号公報

【非特許文献1】T. P. Beebe, Jr., T. E. Wilson, D. F. Ogletree, J. E. Katz, R. Balhorn, M. B. Salmeron and W. J. Siekhaus, Science 243, 370(1989)

【非特許文献2】R. J. Driscoll, M. G. Youngquist and J. D. Baldeschwieler, Nature 346, 294 (1990)

【非特許文献3】J. Wang and A. J. Bard, Anal. Chem. 73, 2207 (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、活性状態を保持した状態で、基板に固定化された鎖状分子を検出するための装置を提供することである。また、本発明の他の目的は、活性状態を保持した状態で、基板に固定化された鎖状分子を明確に視覚化すること、鎖状分子の数を計数すること、鎖状分子の局在化の情報を与えること等を可能とする分子検出装置を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記の課題は、下記の本発明によって達成される。

【0014】

(1) 基板に固定化された鎖状分子を検出するための装置であって、前記基板を保持する治具、前記基板と溶液とを収容する容器、探針、探針の検出器、前記基板又は前記探針を三次元方向に走査する駆動機構、及び、前記駆動機構を制御する駆動制御回路を具備することを特徴とする分子検出装置。

【0015】

(2) さらに、前記鎖状分子を視覚化する手段を有する上記分子検出装置。

【0016】

(3) さらに、前記鎖状分子を計数する手段を有する上記分子検出装置。

【0017】

(4) さらに、前記鎖状分子の局在化の情報を与える手段を有する上記分子検出装置。

【0018】

(5) さらに、鎖状分子が固定化された基板を判別する手段を有する上記分子検出装置。

【0019】

(6) 基板上に固定化された鎖状分子が、基板上に直立して配置された一本鎖分子である上記分子検出装置。

【0020】

(7) 直立して配置された一本鎖分子が、核酸、ペプチド核酸、ペプチド、糖ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、化学合成ポリマーまたはこれらの類似物質である上記分子検出装置。

【0021】

(8) 基板上に固定化された鎖状分子が、直立して配置された一本鎖分子と、前記一本鎖分子に結合可能な一本以上の鎖状分子とを含む多本鎖分子である上記分子検出装置。

【0022】

(9) 多本鎖分子が、核酸、ペプチド核酸、ペプチド、糖ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、化学合成ポリマーまたはこれらの類似物質から選ばれた1種または2種以上の分子の複合体である上記分子検出装置。

【発明の効果】

【0023】

本発明の分子検出装置によれば、DNAチップ、DNAマイクロアレイ、マイクロタイタープレート等、又は、これらに類似する生体物質固定化基板において、鎖状分子の活性を保った状態で、鎖状分子を視覚化すること、鎖状分子の単位面積あたりの個数を計数すること、さらには、鎖状分子の局在化の情報を得ることができる。これにより、前記鎖状分子を固定化した基板を、ある一定の基準により容易に判別することが可能となり、簡便な基板の検査技術を提供することができる。

【0024】

さらには、鎖状分子を固定化した基板を使用し、核酸のハイブリダイゼーション、抗原抗体反応、レセプターアッセイ等を行った後、従来の吸光度測定、蛍光強度測定等に代わる検出方法として、本発明の分子検出装置を使用することも可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明の分子検出装置は、基板に固定化された鎖状分子を検出するための装置であって、前記基板を保持する治具、前記基板と溶液とを収容する容器、探針、前記基板又は前記探針を三次元方向に走査する駆動機構、及び、前記駆動機構を制御する駆動制御回路を具備することを特徴とする。このような分子検出装置として、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy; AFM)、走査型トンネル顕微鏡 (Scanning Tunneling Microscopy; STM) 等の走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope; SPM) に備わる機構の一部又は全部を用いることができる。

【0026】

原子間力顕微鏡は、検出対象と探針との間に働く原子間力を利用、つまり、原子間力によって引き起こされる探針の撓み量を測定することにより、検出対象の表面形状を観測するものである。撓み量の測定は、レーザー光の反射を利用する方法が好ましく、従って、本発明の分子検出装置は、探針の検出器として、レーザー光源及びレーザー光検出器を有することが好ましい。

【0027】

また、原子間力顕微鏡は、探針の動作の違いにより、斥力型、引力型およびタッピング型 (「タッピング型」は、アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタバーバラに所在するデジタルインスツルメント社の商標登録) 等に大別される。本発明においては、鎖状分子が固定化された基板に与えるダメージが斥力型よりも小さく、また、探針の撓み量の検出が引力型よりも容易であるとの観点から、タッピング型の原子間力顕微鏡が好ましく使用される。

【0028】

走査型トンネル顕微鏡は、検出対象と探針との間に流れるトンネル電流を測定することにより、検出対象の表面形状を観測するものである。従って、本発明の分子検出装置は、

探針の検出器として、電圧発生器及びトンネル電流検出器を有することが好ましい。

【0029】

図1は本発明の一実施態様であるAFMを用いた分子検出装置の原理説明図である。

【0030】

測定対象物となる鎖状分子が固定化された基板1は、治具3を用いて容器4の内部にセットされ、また、探針2は容器4に収容される。駆動機構5および6は、三次元方向、つまり、基板1がX軸、Y軸、Z軸方向に動くように構成されている。駆動制御回路7で駆動機構5および6が動く範囲を設定しておき、探針2と試料表面とを接近または接触させて、探針2により鎖状分子が固定化された基板1の表面を走査する。

【0031】

レーザー光源8から出たレーザー光10をレンズ9により集光して探針背部11に照射し、その反射光をレーザー光検出器12で捕らえることにより、探針2の位置情報を得ることができる。つまり、探針2と基板1との間に斥力又は引力が働くと、探針背部11がそれに応じて撓む。探針背部11が撓むと、レーザー光10の反射角が変化し、それに伴いレーザー光検出器12から出力される電気信号に変化が生じる。この電気信号は、電気信号増幅器13を介してコンピューター14に伝えられる。駆動制御回路7は、コンピューター14を通して常に一定の電気信号が得られるように、つまり、探針2と基板1との間に働く原子間力が常に一定になるように、駆動機構5及び6の動きをコントロールするものである。駆動機構5及び6のX軸、Y軸、Z軸方向の位置をコンピューター14を用いて解析することにより、鎖状分子の形状を検出することができる。また、この位置情報の読み取りには、電気的に撓み抵抗の変化を読み取る自己検出型の方法もある。

【0032】

本発明の分子検出装置は、鎖状分子が固定化された基板を視覚化する手段を有することが好ましい。図3は、本発明の視覚化する手段を有する分子検出装置の動作を示すフローチャートである。まず、図3のS1において、探針2が基板1上を走査する。次いで、S2において、検出器12が探針2の位置情報を読み取る。さらに、S3において、視覚化手段（コンピューター14）が駆動機構5又は6のX軸、Y軸、Z軸の位置情報を解析することにより、鎖状分子が固定化された基板1の三次元情報、つまり、鎖状分子の形状を得て、それをディスプレイに表示する。これにより、基板1上のある単位面積当たりの鎖状分子の視覚化情報を得ることができる。

【0033】

図8及び9は本発明の分子検出装置を用いて視覚化された基板である。視覚化する倍率にもよるが、図8及び9において、基板に固定化された鎖状分子は粒子状物として観測される。

【0034】

また、本発明の分子検出装置は、鎖状分子を計数する手段を有することが好ましい。図4は、本発明の計数する手段を有する分子検出装置の動作を示すフローチャートである。図4のS4において探針2が基板1上を走査する。S5において検出器12が探針2の位置情報を読み取る。S6において計数する手段（コンピューター14）が駆動機構5又は6のX軸、Y軸、Z軸の位置情報を解析することにより、任意に決められた高さ以上の粒子（鎖状分子）を認識し（高さ方向のノイズの除去）、S7において計数する手段が駆動機構5又は6のX軸、Y軸、Z軸の位置情報を解析することにより、任意に決められた面積を有する粒子を認識する（面方向のノイズの除去）。S8において計数する手段が認識した粒子の個数を計数し、S9においてディスプレイに結果を表示する。これにより、基板1上のある単位面積当たりのプロービングした鎖状分子の数を計数することができる。

【0035】

また、本発明の分子検出装置は、鎖状分子の局在化の情報を与える手段を有することが好ましい。図5は、本発明の局在化情報を与える手段を有する分子検出装置の動作を示すフローチャートである。図5のS10において探針2が基板1上を走査する。S11において検出器12が探針2の位置情報を読み取る。S12において局在化情報を与える手段



(コンピューター 14) が駆動機構 5 又は 6 の X 軸、Y 軸、Z 軸の位置情報を解析することにより、任意に決められた高さ未満の粒子を認識し (高さ方向のノイズの除去)、S 13 において局在化情報を与える手段が駆動機構 5 又は 6 の X 軸、Y 軸、Z 軸の位置情報を解析することにより、任意に決められた面積を有する粒子を認識する (面方向のノイズの除去)。S 14 において局在化情報を与える手段が認識した粒子の分布を解析し、任意に決められた基準に従い粒子が局在化しているか又は非局在化しているかを判定する。S 15 において結果をディスプレイに表示する。これにより、ある単位面積当たりの鎖状分子の局在化の情報を得ることができる。

#### 【0036】

S 14 における粒子の分布の解析は、従来公知の方法である分散解析、フラクタル解析等の方法により行うことが可能であり、また、認識した粒子と粒子の距離の分布を検討する、基板上の観察した範囲を区分けして個々の区分に存在する粒子数を比較検討する等の方法により行うことも可能である。

#### 【0037】

本発明の分子検出装置の使用目的に応じ、上記 S 6 又は S 12 において任意に決められた高さ未満の粒子を認識してもよく、任意に決められた高さを有する粒子を認識してもよい。同様に、上記 S 7 又は S 13 において任意に決められた面積未満の粒子を認識してもよく、任意に決められた面積以上の粒子を認識してもよい。

#### 【0038】

また、本発明の分子検出装置は、上記の手段により提供された鎖状分子の視覚化、計数、局在化等の情報を基に、鎖状分子が固定化された基板を判別する手段を有していてもよい。図 6 は、本発明の鎖状分子が固定化された基板を判別する手段 (コンピューター 14) の動作を示すフローチャートである。図 6 の S 16 において計数する手段に従って得た鎖状分子の個数を、任意の判定基準により判定する。鎖状分子の個数が任意の判定基準以上である場合 (S 17)、次いで、S 20 において局在化情報を得る手段に従って得た鎖状分子の局在化情報により、鎖状分子が局在化しているか又は非局在化を判定する。鎖状分子の個数が任意の判定基準未満である場合 (S 18)、鎖状分子が固定化された基板 1 は検査不合格となる (S 19)。S 20 における局在化又は非局在化の判定の後、鎖状分子が非局在化している場合 (S 21)、鎖状分子が固定化された基板 1 は検査合格となる (S 24)。鎖状分子が局在化している場合 (S 22)、鎖状分子が固定化された基板 1 は検査不合格となる。これにより、製造工程で、鎖状分子を固定化した基板を検査し、ある一定レベルの基準を持たない物を判別することができる。これらの結果をディスプレイに表示してもよい。

#### 【0039】

本発明の分子検出装置の使用目的に応じ、上記 S 17 において鎖状分子の個数が任意の判定基準未満である場合を検査合格とし、S 18 において鎖状分子の個数が任意の判定基準以上である場合を検査不合格としてもよい。同様に S 21 において鎖状分子が非局在化している場合を検査不合格とし、S 22 において鎖状分子が局在化している場合を検査合格としてもよい。

#### 【0040】

また、鎖状分子が固定化された基板を判別する手段として、基板の複数の個所について鎖状分子の視覚化、計数、局在化の情報を得る等を行い、得られた情報を検討することにより基板の検査を実施することも可能である。例えば、基板上の 10 箇所における鎖状分子の計数結果のばらつきを判定することにより、基板を合格又は不合格に判別することができる。

#### 【0041】

本発明の分子検出装置に使用される容器としては、試料の形態と溶液との反応性を考慮して、樹脂、金属、ガラス等のいずれの材質、形状でもよい。基板に固定化された鎖状分子は、溶液中では自由な運動を行っているが、大気中では隣接分子同士が互いに絡み合っており、基板に密着し、個々の分子を識別することができない。また、基板に密着してしまうと

、分子が活性を失う。本発明の分子検出装置を用いることにより、基板上の鎖状分子の検出を溶液中で行うことができる。測定時に使用する溶液は、鎖状分子が安定に存在できるものであれば特に制限はなく、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム等の塩を含む水系溶液、もしくは緩衝溶液が好ましい。

#### 【0042】

本発明の分子検出装置に使用される探針2は、シリコン、酸化シリコン、窒化シリコン、カーボンナノチューブなど、市販されているものいずれでも用いることが可能であるが、これらに限定されるものではない。本発明においては、窒化シリコンを用いることが好ましい。探針の先端の曲率半径は、20 nm以下が好ましい。より好ましくは、10 nm以下である。

#### 【0043】

本発明において、駆動機構5または6としては、圧電素子、ボイスコイル、機械的な機構などいずれでも用いることが可能であるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、圧電素子である。

#### 【0044】

本発明において、レーザー光源8としていずれのものを用いることも可能である。好ましくは可視光半導体レーザーである。また、レーザー光検出器12としては、二次元的に光で位置情報を捕らえられるものであればいずれの装置を用いることも可能である。好ましくは、フォトダイオード、CCD、CMOSである。

#### 【0045】

図2は本発明の一実施態様であるSTMを用いた分子検出装置の原理説明図である。

#### 【0046】

図2において、図1で示されたいくつかの部分重複するため、図1と共通する部分の説明は省略する。基板16上の鎖状分子と探針19との間にトンネル電流を流すために、電圧発生器21が使用される。駆動機構20により、探針19を鎖状分子に原子数個分の距離まで近づけるとトンネル電流が流れる。この電流は、トンネル電流検出部22で検出され、電気信号に変換される。このトンネル電流の値が一定値として得られるように、駆動制御回路23を用いて探針19を走査し、駆動機構20のX軸、Y軸、Z軸方向の位置情報を、コンピューター24を介することにより鎖状分子の形状として検出することができる。

#### 【0047】

本発明において、駆動機構はAFMにおいては基板を駆動するだけでなく、探針を駆動する方法もある。さらに、STMにおいては、探針を駆動するだけでなく、基板を駆動する方法もある。

#### 【0048】

本発明の分子検出装置は、基板に固定化された鎖状分子を検出するために用いられるものである。本発明において、検出対象となる鎖状分子は、一般に長さ（高さ）が基板の持つ粗さ以上であり、通常一本鎖分子である場合と多本鎖分子である場合がある。本発明の分子検出装置を用いて観察される鎖状分子は、好ましくは各種アレイ、チップ又はマイクロタイプレートに固定されている鎖状分子である。

#### 【0049】

本発明において、一本鎖分子としては、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、ウラシル、ヒポキサンチンを有する人工核酸、核酸誘導体等の核酸又はペプチド核酸（PNA）が一般的である。さらに、ペプチド、糖ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖または化学合成ポリマー（例えばポリメタクリル酸、ポリアクリル酸、ポリビニルイミダゾール、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリルアミン、ポリアクリルアミド、ポリチオフェン酢酸、または、ポリピリジルアセチレン）又はこれらの類似物質など、相補的又は特異的な分子を持つものであれば前述した多本鎖分子の形成が可能であり好ましい。さらに、ポリフェノール、ポリエステル、ポ

リエチレングリコール、ポリアミド酸、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールのような化学合成ポリマーを用いることもできる。

【0050】

また、一本鎖分子として、例えば一部に枝分かれ構造や網目構造を有しているものでもよい。本発明において、一部に枝分かれ構造や網目構造を有している一本鎖分子とは、プロテオグリカンや側鎖を有する化学合成ポリマーのように、共有結合により分子が枝分かれ構造や網目構造を有しているものは勿論のこと、タンパク質の高次構造のようにペプチド鎖が分子内で水素結合、イオン結合、疎水結合等することにより枝分かれ構造や網目構造を有しているものも含まれる。

【0051】

本発明の分子検出装置により検出される一本鎖分子としては、これらに限定されるものではなく、検出が可能であればいずれのものでも検出対象とすることができる。

【0052】

上記一本鎖分子は、通常直立した状態で基板に配置（固定）されている。本発明において基板に配置（固定）することとは、例えばリンカーを介する間接的な結合、または、静電的結合、疎水結合、イオン結合、水素結合を含む、あらゆる物理的な吸着または化学結合で固定化されることである。

【0053】

上記基板とは、一般に、プラスチック、ガラス、金属などの材質からなる、板状、ビーズ状、ウェル、膜、フィルム状のものであり、通常は板状である。

【0054】

一本鎖分子が固定化された基板の例としては、DNAチップ、DNAマイクロアレイ、プロテインアレイ（タンパクチップ）、ペプチドアレイ等の各種アレイ又はチップ等を挙げることができる。

【0055】

本発明において、基板上に固定化された鎖状分子は、直立して配置された一本鎖分子と、前記一本鎖分子に結合可能な1本以上の鎖状分子とを含む多本鎖分子であってもよい。

【0056】

本発明において、多本鎖分子とは、核酸、ペプチド核酸、ペプチド、糖ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、化学合成ポリマーまたはこれらの類似物質から選ばれた1種または2種以上の分子の複合体であることが好ましい。多本鎖分子は、通常、上記一本鎖分子に対して、結合可能な鎖状分子が分子間の静電的結合、疎水結合、イオン結合、水素結合を含む、あらゆる物理的な吸着または化学結合により複合体を形成したものをいう。

【0057】

本発明においては、一本鎖分子と結合可能な鎖状分子との結合は、相補的又は特異的な結合であることが好ましい。したがって、本発明でいう多本鎖分子としては、二本鎖DNA、二本鎖RNA、二本鎖PNA、DNAとRNAのハイブリッド、DNAとPNAのハイブリッド、RNAとPNAのハイブリッド、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、ウラシル、ヒポキサンチンを有する人工核酸や核酸誘導体と、DNA、RNAまたはPNAとのハイブリッド、三本鎖核酸などの鎖状分子が相補的に結合した複合体を挙げることができる。さらに本発明でいう多本鎖分子としては、これらに限定されるものではなくペプチド、糖ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖または化学合成ポリマーなど他の鎖状分子が相互作用し結合した複合体全てを含む。したがって、本発明でいう多本鎖分子としては、4本のポリペプチド鎖からなる抗体や、サブユニット構造を有する酵素などを挙げることができ、さらには抗原-抗体複合体、酵素-基質複合体、アビジン-ビオチン複合体などの鎖状分子が特異的に結合した複合体を挙げることができる。

【0058】

多本鎖分子が固定化された基板の例としては、マイクロタイタープレート、抗体アレイ、タンパク質相互作用アレイ、酵素アレイ等を挙げることができる。

## 【0059】

本発明において、検出対象が、基板に対して直立に配置された一本鎖分子である場合、特に枝分かれ構造や網目構造を有さない一本鎖分子単独では折れ曲がってしまうために、分子が隣接していると、互いに重って個々の分子として認識され難いことがある。そこで配置された一本鎖分子に対して、結合可能な一本鎖分子を1種類以上系に加えて、多本鎖分子を形成させることが好ましい。また、検出対象となる鎖状分子が、短い(低い)分子である場合など、本発明の分子検出装置を用いて認識され難いことがある。この場合も、配置された鎖状分子に対して、結合可能な鎖状分子を1種類以上系に加えて、長い(高い)分子を形成させることが好ましい。検出のために結合させた鎖状分子は、分子検出装置を用いた検出の後、解離させればよい。

## 【0060】

例えばDNAの場合には相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを加えて、二本鎖DNAを形成させる。そうすることで、その分子の構造は剛直になり、探針の接触にも耐え、検出感度が向上するので好ましい。そして、探針によって走査し、形状を得ることによって、多本鎖分子の検出を行う。

## 【0061】

多本鎖分子を形成させる際の条件は、特に限定するものではなく、一般的に通常用いられている方法に準じて良い。例えばDNAの二本鎖形成、即ちハイブリダイゼーションは、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム、リン酸ナトリウム等の塩を含む水系溶媒、もしくは緩衝溶液中で行われる。また、タンパク質分子を含む多本鎖の形成、例えば抗原が吸着した基板への抗体の結合(抗原抗体反応)は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム、リン酸ナトリウム等の塩を含む水系溶媒、もしくは緩衝溶液中で行われる。

## 【0062】

本発明の分子検出装置は、DNAチップ、DNAマイクロアレイ、マイクロタイタープレート等の鎖状分子を固定化した基板の検査を行うための装置として用いられる他、これらの鎖状分子を固定化した基板を使用し、核酸のハイブリダイゼーション、抗原抗体反応等を行った後、従来の吸光度測定、蛍光強度測定等に代わる核酸、タンパク質等の検出方法に使用することも可能である。本発明の分子検出装置を用いれば、分子一つ一つを認識することができるため、従来の検出方法に比べ少量の試料であっても検出可能であり、高感度の検出方法の提供、さらにはチップ、アレイ等の縮小が可能である。

## 【実施例】

## 【0063】

以下に本発明の実施例を示すが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 【0064】

## [実施例1]

## &lt;表面への官能基の導入&gt;

ポリスチレン基板(1.5cm×1.5cm)に低圧水銀灯照射を90秒間(500mJ/cm<sup>2</sup>)照射して、カルボキシル基を導入する。

## 【0065】

<dT<sub>20</sub>(一本鎖分子)固定化>

まず水酸化ナトリウムでpH6.0に調整した0.1M MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)緩衝液を用いて、25mM EDC(1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide-HCl)溶液を調整した。次に本溶液及びdT<sub>20</sub>(5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-(thymidine 5'-monophosphate)<sub>20</sub>)を用いて溶液(1.3μM dT<sub>20</sub>/EDC溶液)を調整し、この溶液を基板に100から150μl滴下し、60℃で6時間インキュベートした反応後、純水で洗浄して、過剰な溶液を除去した。

## 【0066】

## &lt;一本鎖核酸(一本鎖分子)の観察&gt;

一本鎖DNAを固定化した基板をTE緩衝液(Tris-EDTA緩衝液、10mM Tris、1mM EDTA、pH7.8、0.5M塩化ナトリウムを含む)中で、本発明の分子検出装置によりdT<sub>20</sub>固定化基板表面の500nm×500nmの領域を走査し、視覚化した。

【0067】

図7は、基板を本発明の分子検出装置を用い図3に従い視覚化したものである。

【0068】

図8は、上記手法によりdT<sub>20</sub>を固定化した基板を、本発明の分子検出装置を用い図3に従い視覚化したものである。高さ約5nmの粒子(鎖状分子)がやや不鮮明に確認され、粒子が重なり合っている様子が確認された。

【0069】

<二重らせん(多本鎖分子)の形成>

相補的な一本鎖核酸にdA<sub>20</sub>-FAM(5'-5-carboxy-fluorescein-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-(2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate)<sub>20</sub>)を使用した。このdA<sub>20</sub>-FAMをTE緩衝液に溶解した(20pmol/μl)。本溶液100から150μlをdT<sub>20</sub>固定化基板に滴下した。1時間後、過剰なdA<sub>20</sub>-FAM溶液をTE緩衝液で洗浄除去した。

【0070】

<二重らせん(多本鎖分子)の観察>

基板を前記記載のTE緩衝液中で、本発明の分子検出装置によりdT<sub>20</sub>固定化基板表面の500nm×500nmの領域を走査し、視覚化した。

【0071】

図9は、上記手法により形成した二本鎖核酸を、本発明の分子検出装置を用い図3に従い視覚化したものである。高さ約8nmの粒子(鎖状分子)が鮮明にかつ規則的に観察できた。

【0072】

[実施例2]

実施例1において得た表面に官能基を導入した基板と、dT<sub>20</sub>を固定化した基板と、dT<sub>20</sub>とdA<sub>20</sub>-FAMからなる二重らせんを形成した基板それぞれについて、図4に従い基板上の分子の計数を行った。

【0073】

高さ方向の閾値は、対象の分子の高さが約8nmであることから、dT<sub>20</sub>を固定化した基板においては分子の折れ曲がりを考慮して4.5nmに設定し(高さ4.5nm以上の分子を検出した。)、官能基を導入した基板及びdT<sub>20</sub>とdA<sub>20</sub>-FAMからなる二重らせんを形成した基板においては7.5nmに設定した(高さ7.5nm以上の分子を検出した。)。また、検出する粒子の面積は、高さ方向の閾値における粒子の横断面の面積が50nm<sup>2</sup>以上2000nm<sup>2</sup>以下と設定した(高さ方向の閾値における粒子の横断面が50nm<sup>2</sup>以上2000nm<sup>2</sup>以下の面積を有する分子を検出した。)。

【0074】

なお、本実施例において設定した粒子の面積範囲は、以下の方法により求めたものである。

【0075】

1) 図4のS7において、計数する手段が駆動機構5又は6のX軸、Y軸、Z軸の位置情報を解析することにより、粒子の形状像を得る。解像度にもよるが、dT<sub>20</sub>からなる一本鎖分子及びdT<sub>20</sub>とdA<sub>20</sub>-FAMからなる多本鎖分子は、円錐形又は山形に類似した形状として認識される。

【0076】

2) 任意の粒子の形状像をその頂点を通る縦断面により二分し、任意の粒子の形状像の断面図を得る(図13)。

【0077】

3) 断面図の半値幅を求め、その半値幅を粒子の直径とし、 $(\text{直径} \times 1/2)^2 \times \pi$ に

より、(粒子高さ $\times 1/2$ )の高さにおける粒子の横断面の面積を求める。

【0078】

4) 得られた面積の30%の値を、認識する粒子の面積範囲の下限値とする(50 nm<sup>2</sup>)。

【0079】

5) 得られた面積の1000%の値を、認識する粒子の面積範囲の上限値とする(2000 nm<sup>2</sup>)。

【0080】

認識する面積範囲を求める方法は上記に限定されるものではなく、本発明の分子検出装置を使用する目的に応じ、最適な方法を使用すればよい。

【0081】

図10は基板のノイズ除去後の解析像である。黒い部分が高さ7.5 nm未満の部分(高さ方向のノイズとして除去された部分)、薄い点が高さ7.5 nm以上、面積50 nm<sup>2</sup>未満2000 nm<sup>2</sup>超の部分(面方向のノイズとして除去された部分)である。500 nm $\times$ 500 nmの領域で計数した結果、基板に固定化された鎖状分子は0個であった。

【0082】

図11はdT<sub>20</sub>を固定化した基板のノイズ除去後の解析像である。黒い部分が高さ4.5 nm未満の部分(高さ方向のノイズとして除去された部分)、薄い点が高さ4.5 nm以上、面積50 nm<sup>2</sup>未満2000 nm<sup>2</sup>超の部分(面方向のノイズとして除去された部分)、濃い点が高さ4.5 nm以上、面積50 nm<sup>2</sup>~2000 nm<sup>2</sup>の部分(鎖状分子としてカウントされた粒子)である。500 nm $\times$ 500 nmの領域で計数した結果、基板に固定化された鎖状分子は93個であった。

【0083】

図12は固定化したdT<sub>20</sub>とdA<sub>20</sub>-FAMの二重らせんを形成した基板のノイズ除去後の解析像である。黒い部分が高さ7.5 nm未満の部分(高さ方向のノイズとして除去された部分)、薄い点が高さ7.5 nm以上、面積50 nm<sup>2</sup>未満2000 nm<sup>2</sup>超の部分(面方向のノイズとして除去された部分)、濃い点が高さ7.5 nm以上、面積50 nm<sup>2</sup>~2000 nm<sup>2</sup>の部分(鎖状分子としてカウントされた粒子)である。500 nm $\times$ 500 nmの領域で計数した結果、基板に固定化された鎖状分子は180個であった。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】本発明の一実施例の分子検出装置(AFM)の原理説明図である。

【図2】本発明の一実施例の分子検出装置(STM)の原理説明図である。

【図3】本発明の視覚化する手段を有する分子検出装置の動作を示すフローチャートである。

【図4】本発明の計数する手段を有する分子検出装置の動作を示すフローチャートである。

【図5】本発明の局在化情報を与える手段を有する分子検出装置の動作を示すフローチャートである。

【図6】本発明の基板を判別する手段の動作を示すフローチャートである。

【図7】本発明の分子検出装置を用いて視覚化した紫外線照射したポリスチレン基板である。

【図8】本発明の分子検出装置を用いて視覚化した鎖状分子を固定化した基板である。

【図9】本発明の分子検出装置を用いて視覚化した二重らせんを固定化した基板である。

【図10】紫外線照射したポリスチレン基板について、高さ方向及び面方向のノイズを除去した後の計数される粒子を示す図である。

【図11】dT<sub>20</sub>を固定化した基板について、高さ方向及び面方向のノイズを除去

した後の計数される粒子を示す図である。

【図 1 2】二重らせんを固定化した基板について、高さ方向及び面方向のノイズを除去した後の計数される粒子を示す図である。

【図 1 3】任意の粒子の形状像を、その頂点を通る縦断面により二分して得た断面図である。

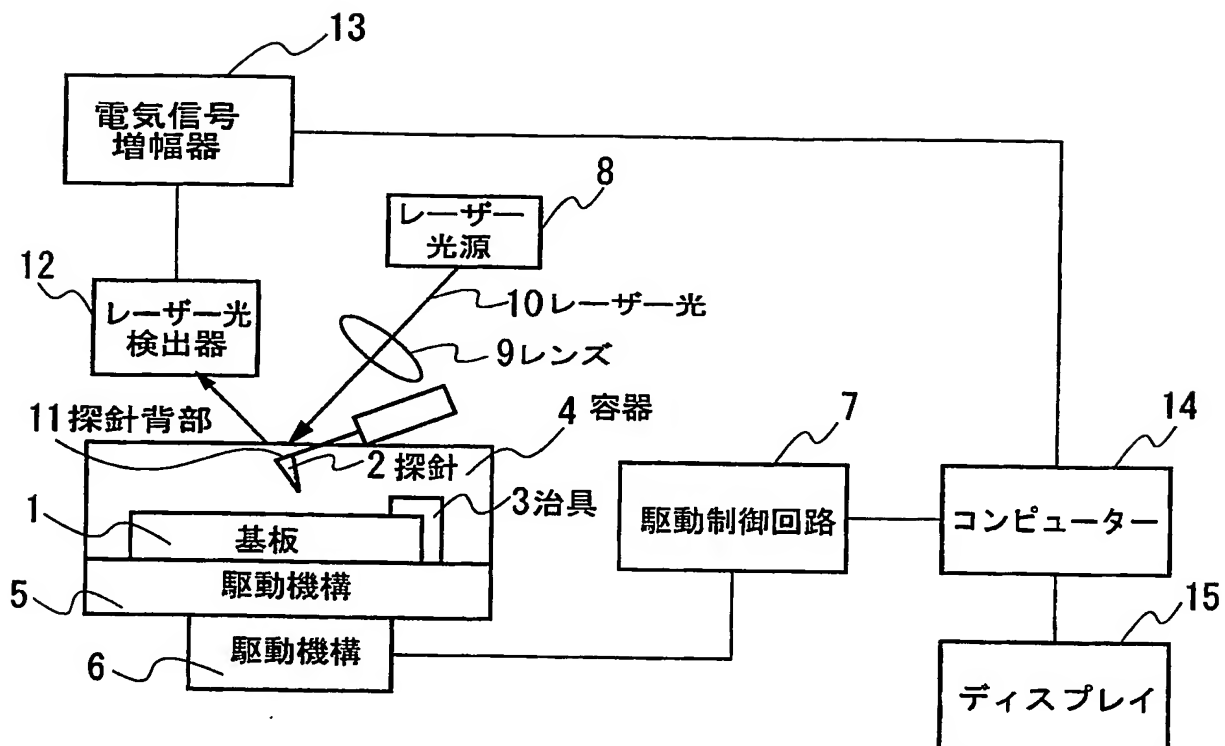
【符号の説明】

【 0 0 8 5 】

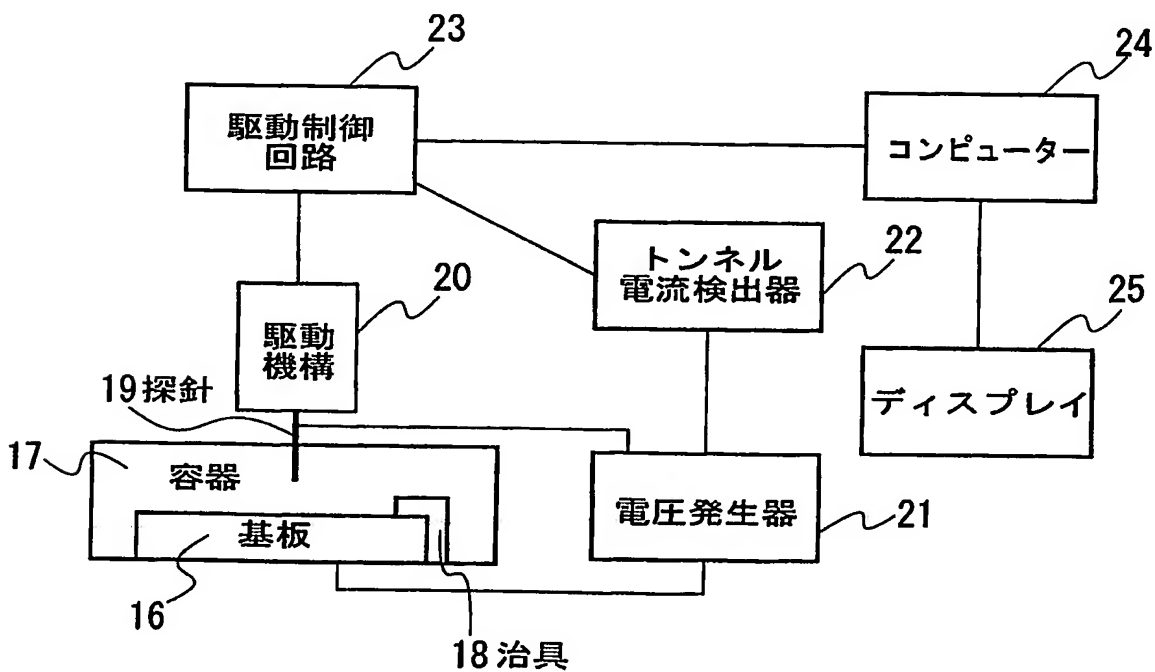
- 1 基板
- 2 探針
- 3 治具
- 4 容器
- 5 駆動機構
- 6 駆動機構
- 7 駆動制御回路
- 8 レーザー光源
- 9 レンズ
- 10 レーザー光
- 11 探針背部
- 12 レーザー光検出器
- 13 電気信号増幅器
- 14 コンピューター
- 15 ディスプレイ
- 16 基板
- 17 容器
- 18 治具
- 19 探針
- 20 駆動機構
- 21 電圧発生器
- 22 トンネル電流検出器
- 23 駆動制御回路
- 24 コンピューター
- 25 ディスプレイ

【書類名】 図面

【図 1】

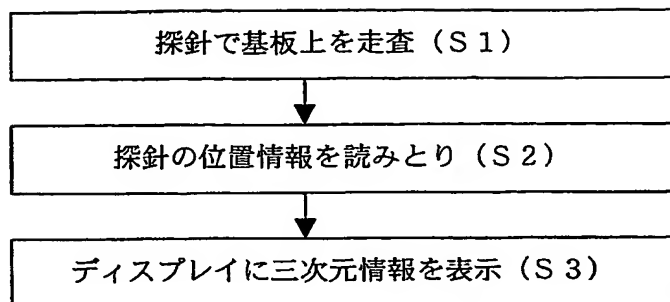


【図 2】

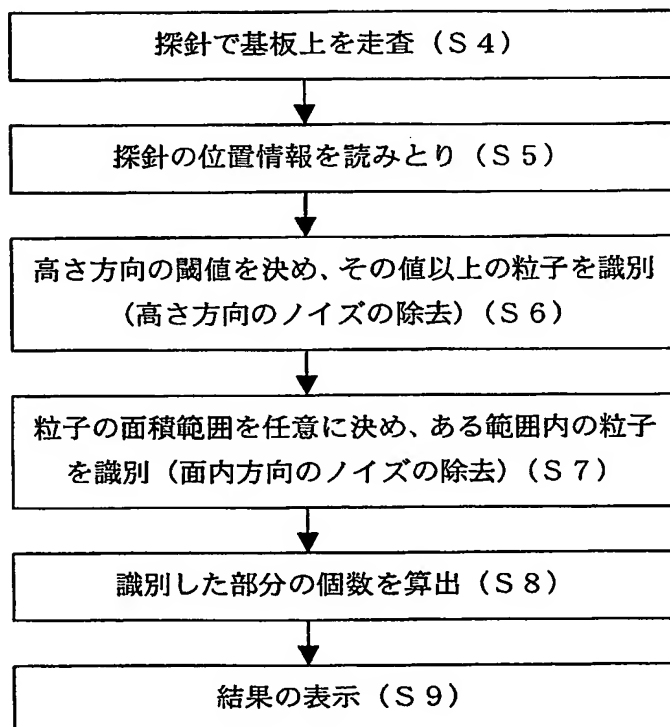




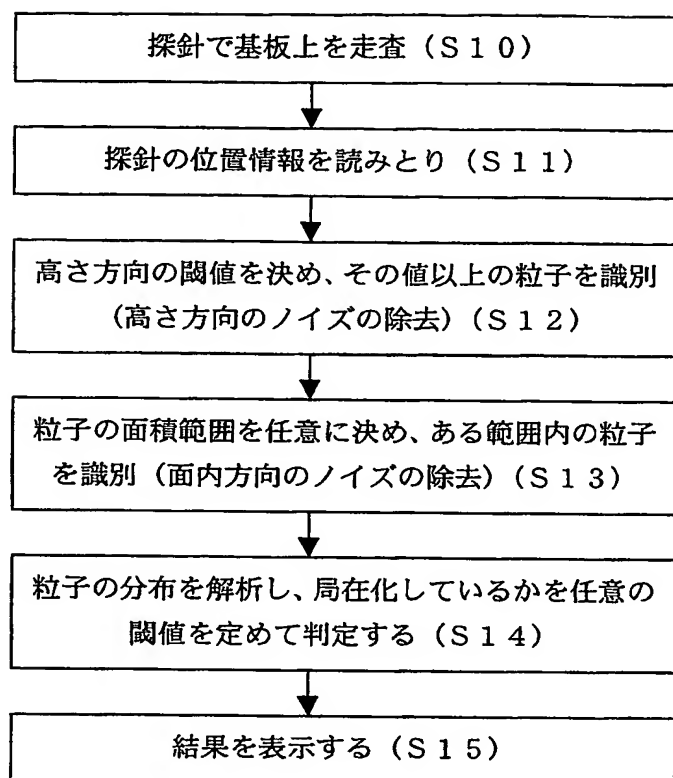
【図 3】



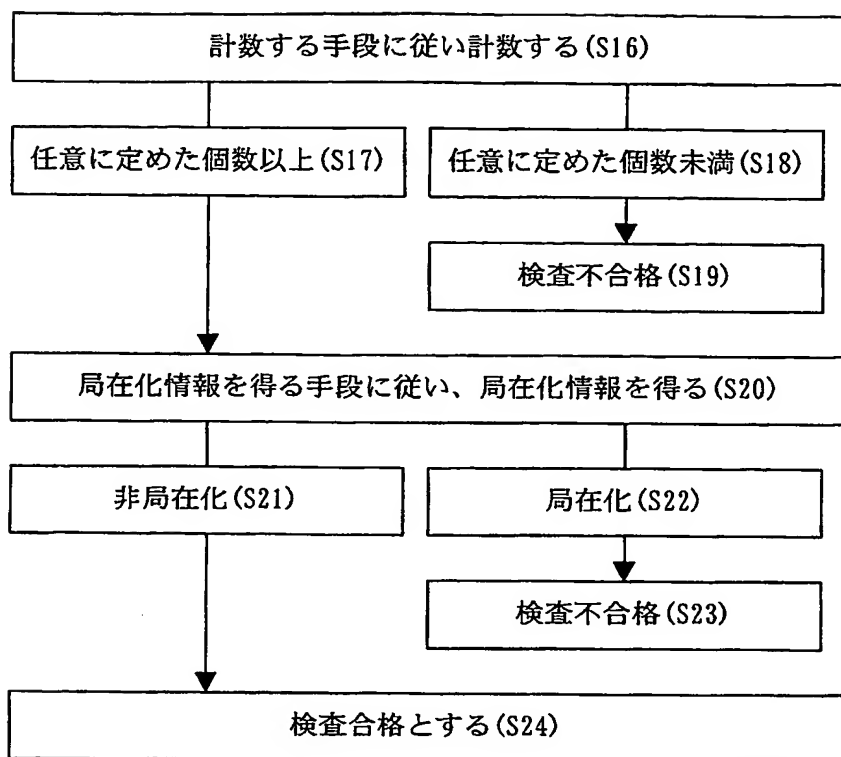
【図 4】



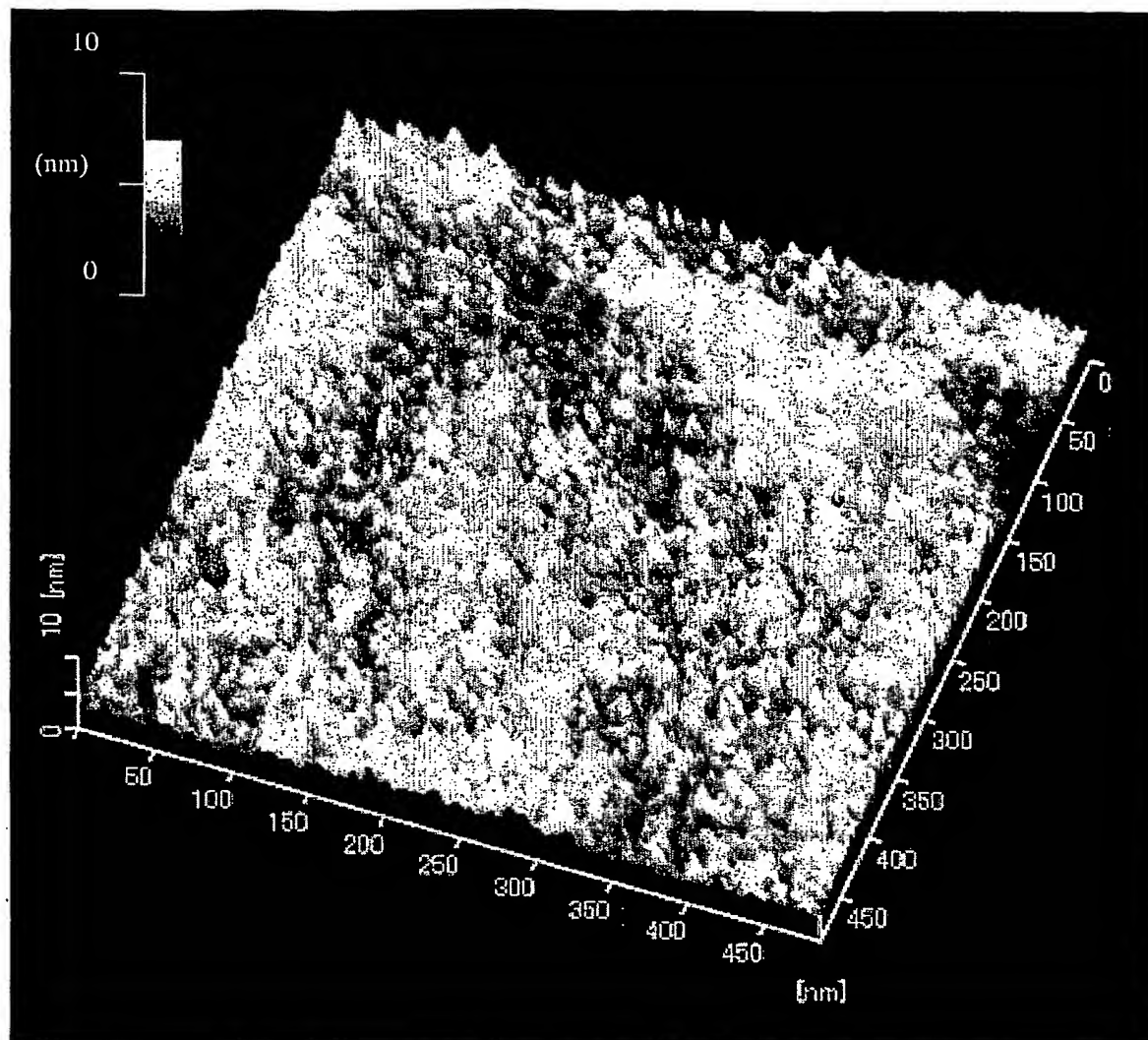
【図 5】



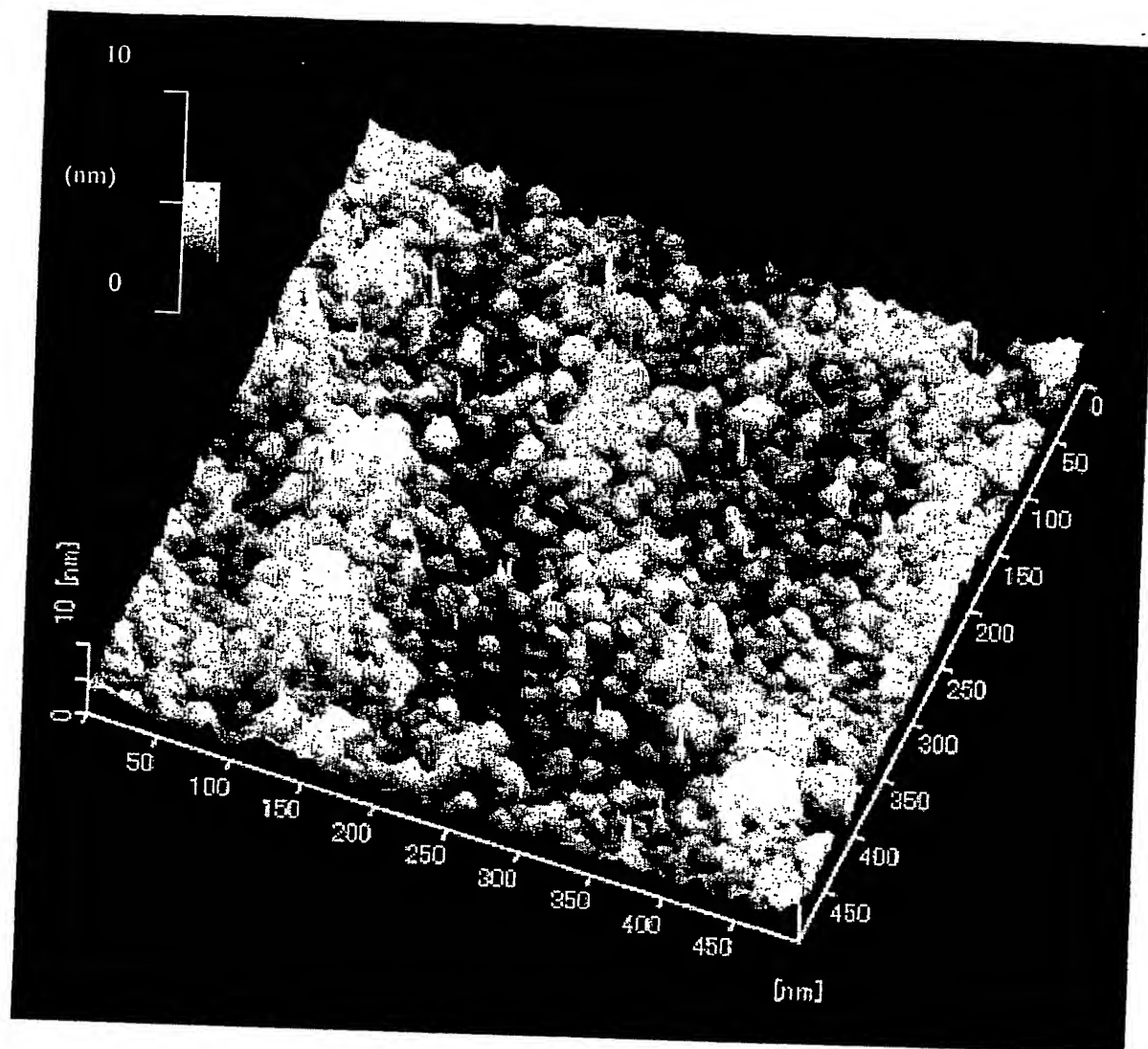
【図 6】



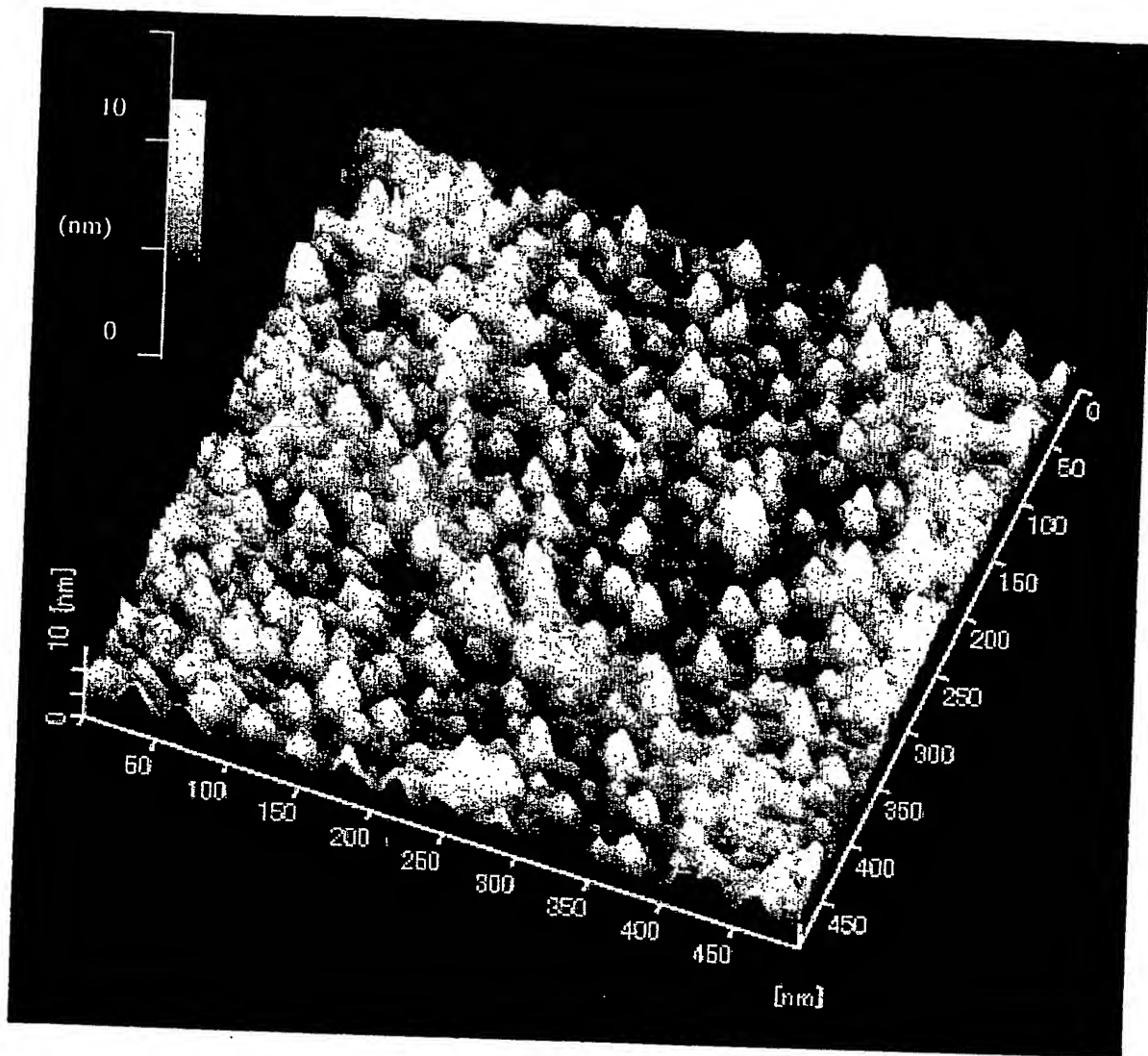
【図 7】



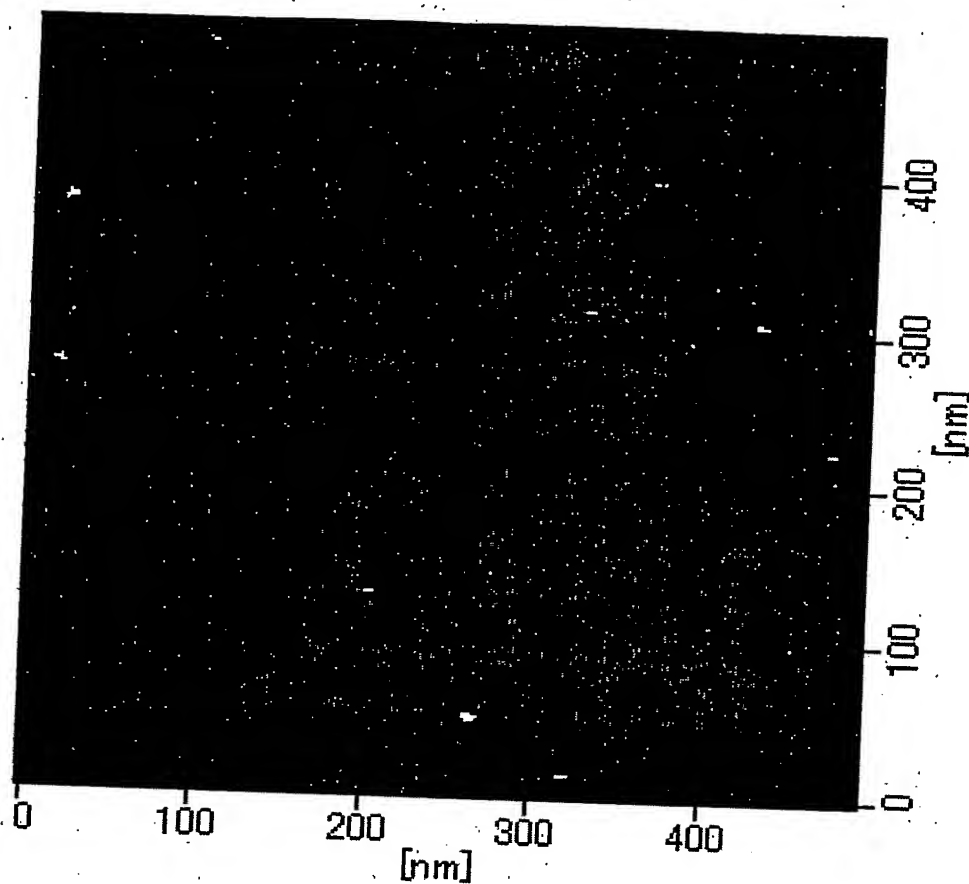
【図 8】



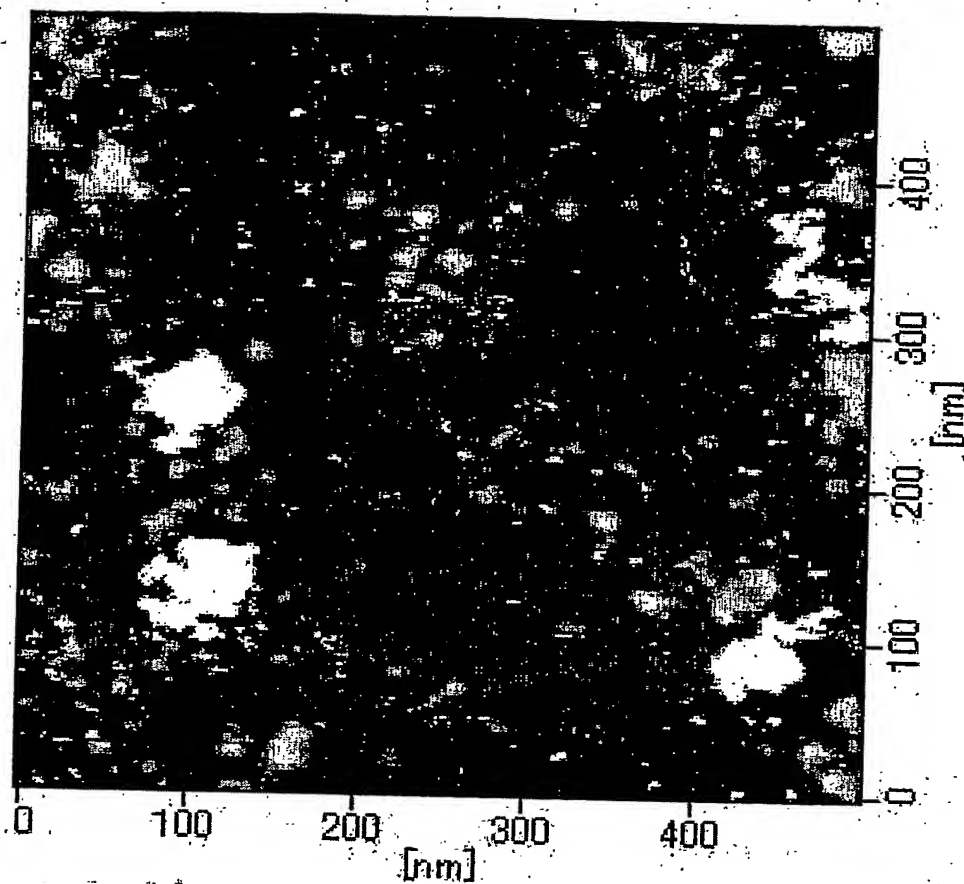
【図 9】



【図 10】

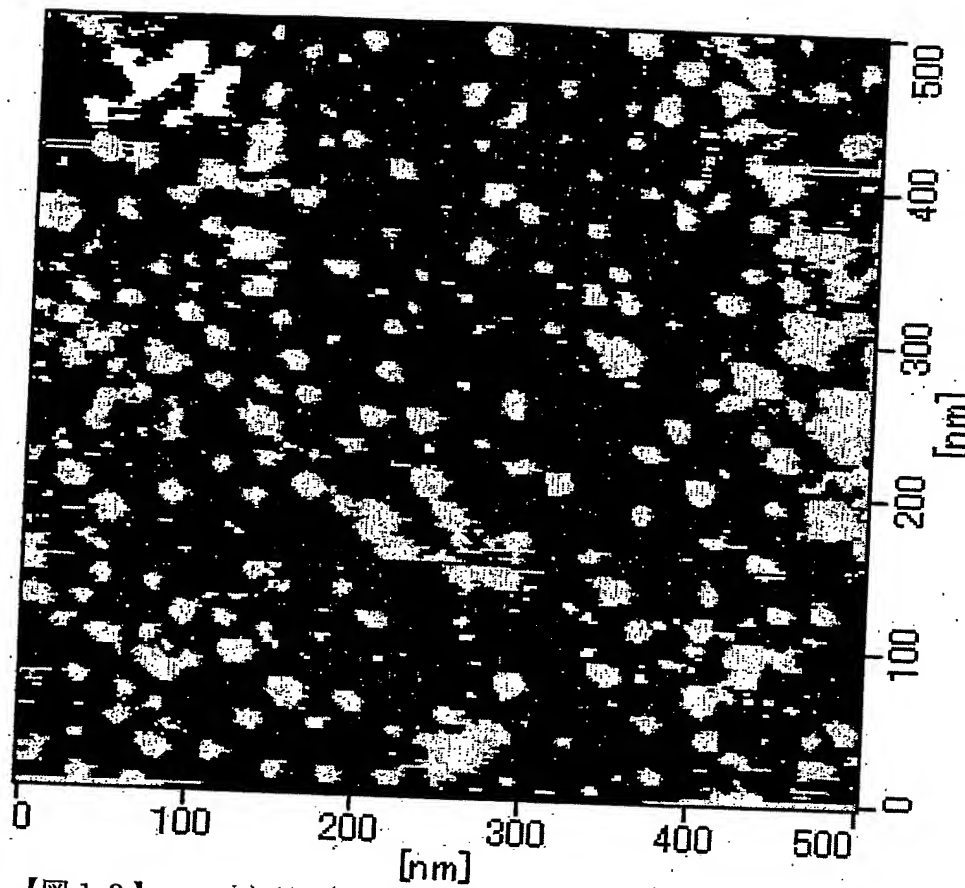


【図 11】

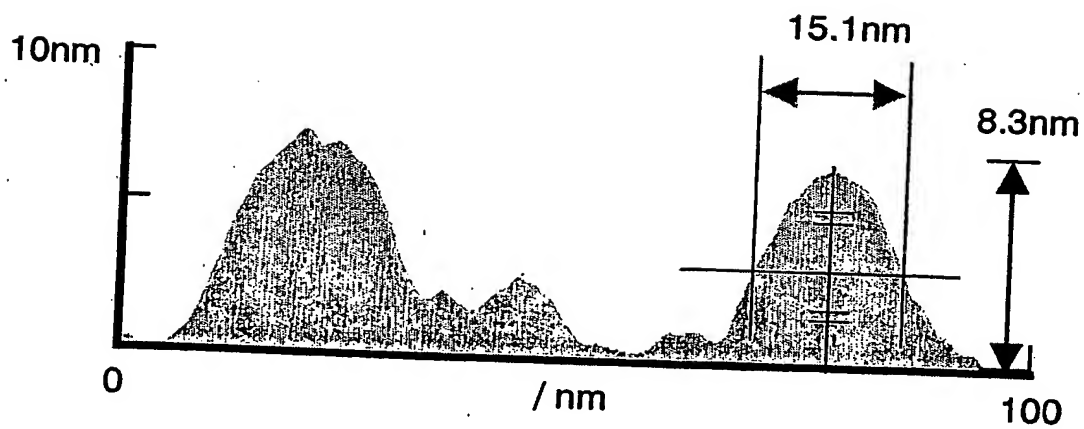




【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 活性状態を保持した状態で、基板に固定化された鎖状分子を検出するための装置を提供すること。

【解決手段】 基板に固定化された鎖状分子を検出するための装置であって、前記基板を保持する治具、前記基板と溶液とを収容する容器、探針、探針の検出器、前記基板又は前記探針を三次元方向に走査する駆動機構、及び、前記駆動機構を制御する駆動制御回路を具備することを特徴とする分子検出装置。

【選択図】 図 1

特願 2003-433969

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000004455]

1. 変更年月日

1993年 7月27日

[変更理由]

住所変更

住所

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

氏名

日立化成工業株式会社